BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

⑲日本国特許庁(JP)　⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)　平1-249717

⑤1Int.Cl.⁴	識別記号	庁内整理番号	㊸公開　平成1年(1989)10月5日
A 61 K 9/10	327	F-7417-4C	
C 07 D 251/46		7822-4C	

審査請求　未請求　請求項の数 1　(全7頁)

⑤4発明の名称　リポソームの製造方法

㉑特　願　昭63-76862

㉒出　願　昭63(1988)3月30日

㉗発明者　小野　光則　神奈川県南足柄市中沼210番地　富士写真フイルム株式会社内

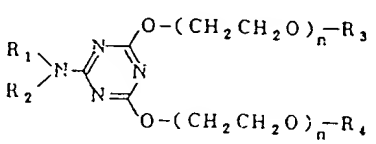
㉑出願人　富士写真フイルム株式会社　神奈川県南足柄市中沼210番地

明　細　書

1. 発明の名称　リポソームの製造方法

2. 特許請求の範囲

式〔Ⅰ〕で表わされる2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-アミノ-s-トリアジン誘導体と脂質を用いることを特徴とするリポソームの製造方法。



Ⅰ

式中、nは、6～200の整数を表わしR₁、R₂は水素原子、アルキル基、アルキルカルボニル基、アルキルスルホニル基を表わす。R₃、R₄は水素原子又はメチル基を表わす。ただし、式Ⅰのアミノ基は酵素、あるいは蛋白質に含まれるアミノ酸基を表さない。

3. 発明の詳細な説明

(発明の分野)

本発明は安定なリポソームの製造に有用な2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-置換-s-トリアジン誘導体に関する。

(従来の技術)

リポソームは、通常水性物質により相互に一定の間隔を保つた多数のリン脂質二層からなる(小胞といわれる)ことが知られている。かようなリポソームを薬剤の運搬体として応用しようとする試みが多数報告されている。(例えばG. Gregoriadis, New Engl. J. Med., 295, 765(1976))

しかし薬剤の運搬体として利用するに際し、大きな欠点が指摘されてきた。即ち、非共有結合性相互作用による分子集合体であるという宿命ゆえの構造の不安定性、薬剤のもれ現象である。従来、この点を改良する目的で、たとえば多糖で被覆したリポソームの製法(特開昭61-69801号)や水素結合により構造強化されたリン脂質(日本化学会誌 569頁 1987年)が開発され

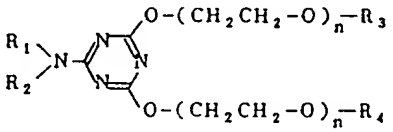
ている。しかし未だ充分とは言いがたく新しい方法の開発が強く望まれているのである。

（発明の目的）

本発明の目的は、内包する薬物のもれが少ない安定なリポソームの製造法を提供することである。

（発明の構成）

本発明は、リポソーム膜を、脂質および式Ⅰで示される2，4－ビス（ポリエチレングリコール）－6－置換アミノ－s－トリアジン誘導体より構成することを特徴とするポリソーム膜の製造方法に関する。



式Ⅰにおいて、nは3～200の整数を表わす。好ましくは8～200であり混合物であつてもよい。混合物の場合のポリエチレングリコール部の平均分子量は350～5000が望ましい。

式中R_1、R_2は水素原子、アルキル基、アルキルカルボニル基、アルキルスルホニル基を表わす。

アルキル基の場合、直鎖でも分枝状でもよい。アルキル基上には置換基を有していてもよく、置換基としてはアルキルカルボキシル基、アルキルカルバモイル基、アルキルチオ基、アルコキシ基の中から選ばれる。R_1、R_2がアルキル基を表わす場合、望ましくは炭素数が8～30ケのものである。

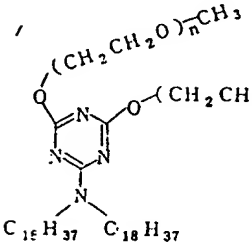
R_1、R_2がアルキルカルボニル基を表わす場合その炭素数は望ましくは、8～30ケのものである。そのアルキル基は直鎖、分枝状いずれでもよく前記のような置換基を有していてもよい。

R_1、R_2がアルキルスルホニル基を表わす場合、その炭素数は、望ましくは8～30ケのものである。そのアルキル基直鎖、分枝状いずれでもよく、前記のような置換基を有していてもよい。

式ⅠにおいてR_3、R_4は水素原子又はメチル基を表わす。

次に式Ⅰで示される化合物の具体例を列挙するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

1

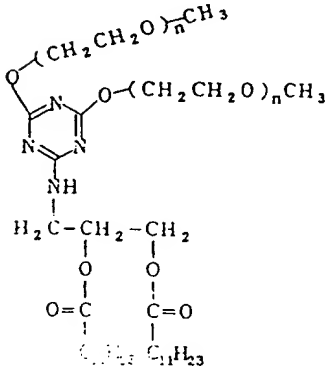


白色粉末

m.p. 109～113°

（ここに示すnは単一ではなく平均分子量が5000の混合物である。（生化学工業㈱より容易に入手できる。実施例参照））

2

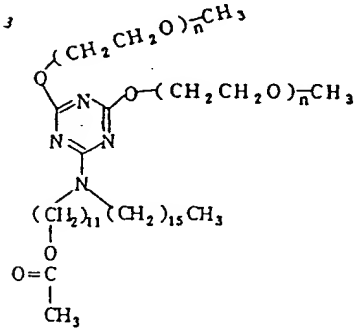


白色粉末

m.p. 98°～102°

nは1と同じ

3

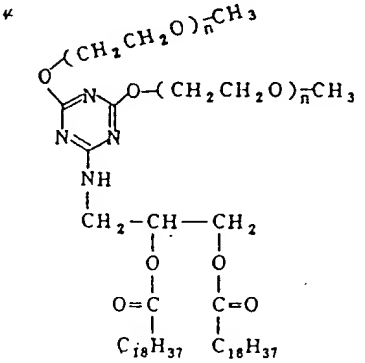


白色粉末

m.p. 120～12[illegible]°

nは1と同じ

4

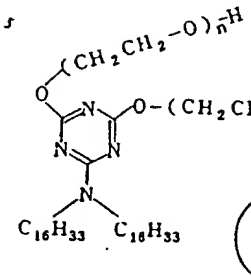


白色結晶

m.p=120～123°

nは1と同じ

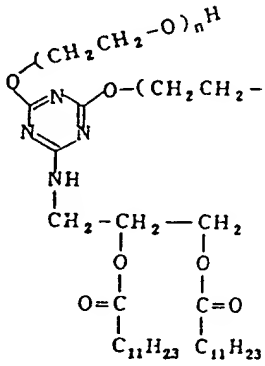
5



油状

ここに示すnは単一ではなく平均分子量が400の混合物である。

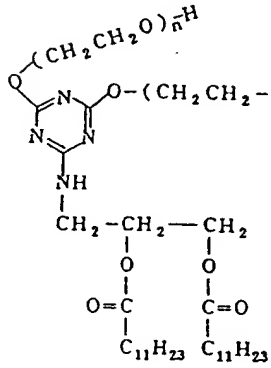
7



油状

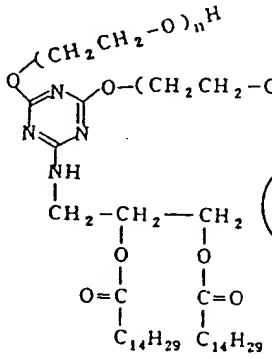
ここに示すnは単一ではなくポリエーテル部の平均分子量が600の混合物である。

6



nは5と同じ

8

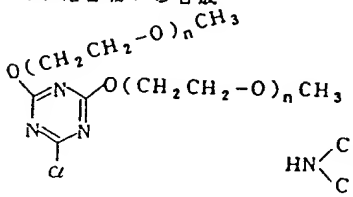


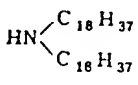
油状

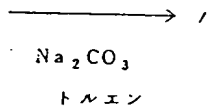
ここに示すnは単一ではなくポリエーテル部の平均分子量が1000の混合物である。

合成例

例示化合物1の合成







（生化学工業㈱製 活性PEG_2）

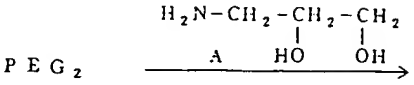
Na_2CO_3

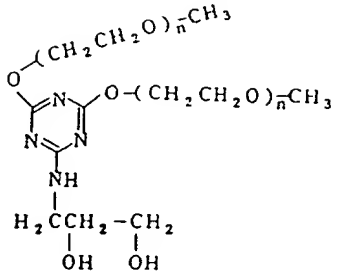
トルエン

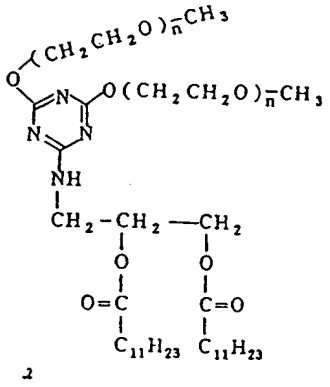
トルエン30ml中に（Na_2CO_3 1.0g）とアミン体1gを入れ室温下かくはんした。その中に、生化学工業㈱製活性PEG_2 1gを入れ室温で2時間反応させた。反応後蒸留水を5ml加え不溶物を沪別し、沪液をセファロースCLBカラムにかける。（300ml）水にて溶離し、10mlづつのFractionに分けFraction 1 to 15の液を減圧濃縮すると目的の1が白色粉末として得られた。0.8g。

構造はNMRにより確認した。

例示化合物2の合成

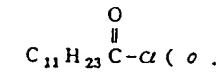






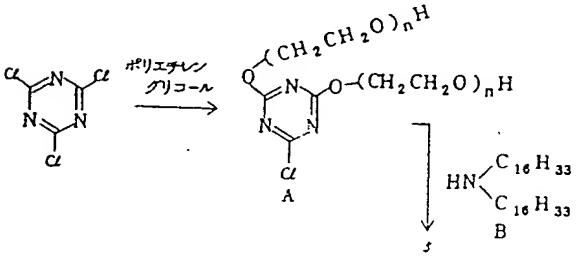
テトラヒドロフラン30mlの中にAを2g入れ、室温でかくはんした。その中に活性化PEG2を1g入れ室温で2時間かくはんした。例示化合物1の合成の分離条件と同様にセファロース4Bによるゲル沪過を行いBを0.7g得た。

化合物B0.5gを無水テトラヒドロフランに溶解しトリエチルアミンを2ml加える。その中に



(0.3g)をテトラヒドロフラン3mlに溶解したものを滴下した。1時間後、テトラヒドロフランを減圧留去し水を加え、不溶物を沪別し沪液を濃縮、冷却すると目的とする化合物2が0.43g得られた。

例示化合物5の合成



ポリエチレングリコール(平均分子量400;和光純薬製)80gを無水テトラヒドロフラン300mlに加え冷却下、NaH(60%分散物)8.0gを徐々に加え、室温に戻して1時間かくはんした。

その混合物の中にトリクロルトリアジンを1.4g加え室温で2時間かくはんしその後油浴60°で1時間かくはんした。テトラヒドロフランを減圧留去後クロロホルムに再溶解しシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製すると(シリカゲル3kg;溶離液クロロホルム)目的とする化合物Aが5.3g油状物として得られた。

アミン体B4.7gとトリエチルアミン2gをテトラヒドロフラン30mlに溶解した。その中に化合物Aを9.1g加え室温で3時間かくはんした。テトラヒドロフランを減圧留去して残渣を、クロロホルムに再溶解しカラムクロマトグラフィーにより分離精製すると(シリカゲル400g;溶離液クロロホルム)目的とする5が7.1g得られた。

としては、卵黄、大豆あるいはその他の動・植物に由来するホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンや、合成によつて得られるジパルミトイルレシチン、ジステアロイルレシチン、ジミリストイルレシチン等を挙げることができる。

次にリポリームに取りこませる親水性薬物としては例えばアドリアマイシン、アクチノマイシン、マイトマイシン、1-β-アラビノフラシルシトシン、ブレオマイシン、シスプラチン等の抗がん剤、インターフエロン等の抗ウイルス剤、アミノ配糖体（例えば、ゲンタマイシン）、β-ラクタム系（例えばスルペニシリン、セフオチアム、セフメノキシム）等の抗生物質、TRH、リユウプロライド、インスリン等のペプチドホルモン剤、リゾチーム、アスパラギナーゼ、グリコシダーゼ等の酵素剤、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド等の免疫賦活剤、イムノグロブリン、各種ト

本発明に係るリポソーム製剤中の式1で表わされる化合物の配合量は特に限定されないが、好ましくは、リポソームを形成し得る複合リン脂質1に対し0.1～1.0（重量比）の配合比である。

またステロール等の添加物を混合してもよい（例えば、コレステロール、β-シトステロール、スチグマステロール、カンペステロールなど）。

式1で表わされる化合物とリン脂質を用いてリポソームを形成させるには通常のリポソーム形成法すなわちボルテクスイング法〔A. D. Bangham, J. Mol. Biol., 13, 238（1965）〕、ソニケーション法〔C. Huang, Biochem., 8, 344（1969）〕、プレベシクル法〔H. Trauble, Neurosci. Res. Prog. Bull., 9, 273（1971）〕、エタノール注入法〔S. Batzri, Biochem. Biophys. Acta., 298, 1015（1973）〕、フレンチプレス押出法〔Y. Barenholiz., FEBS. Lett., 99, 210（1979）〕、コール

酸除去法〔Y. Kagawa, J. Biol. Chem., 246, 5477（1971）〕、トリトンX-100パッチ法〔W. J. Gerritsen, Eur. J. Biochem., 85, 255（1978）〕、Ca^{2+}融合法〔D. PaPahadjopoulos, Biochem. Biophys. Acta. 394, 483（1975）〕、エーテル注入法〔D. Deamer, Biochem. Biophys. Acta., 443, 629（1976）〕、アニーリング法〔R. Lawaczeck, Biochem. Biophys. Acta, 443, 313（1976）〕、凍結融解融合法〔M. Kasahara, J. Biol. Chem., 252, 7384（1977）〕、W/O/Wエマルジョン法〔S. Matsumoto, J. Colloid Interface Sci., 62, 149（1977）〕、逆相蒸発法〔F. Szoka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194（1978）〕など多くの方法が知られているが、本発明では上記いずれの調製法を用いてもよくまたこれらに限定されるものではない。

（発明の効果）

本発明の化合物は、脂質を水中に分散させた時に形成されるリポソームの内包物のもれを少なくするのに有効な化合物である。すなわち式1で表わされるポリエチレングリコール誘導体をリン脂質と混合することによりリポソームの表面がポリエーテル被覆され、リポソーム内から内包物のもれが少なくなる。式1で表わされる化合物は、クラウンエーテルの基本構造を有しており、生体内の豊富なNa^+、K^+を取りこみ表面を強固に保護する。また表面に強い荷電を発生することによりリポソーム自体の凝集も抑制することができる。加えてエーテル鎖は、他の脂質の親水性部と直接あるいは、水分子等を介して水素結合することによりリポソーム内包からの内包物のもれを抑制する。

また式1で表わされる化合物の主鎖部を占るポリエチレングリコール部は、人工脂質の欠点である生体内毒性という観点でも無害であることがすでに多くの動物実験で確かめられている（日本癌

化学治療雑誌、11巻、2227頁、1984年）。上記の観点においても本発明の効果は大きいのである。

実施例1.

卵黄レシチン30mg、例示化合物2（10mg）、コレステロール（1.4mg）をクロロホルム（3ml）に溶解し減圧留去して薄膜を作つた。充分に乾燥後カルボキシフルオレセインのBuffer溶液（200mM；Tris-HCl Buffer pH=8.6；200mM NaCl含有）3mlを加えて15分間ボルテクシングを行いその後プローブ型の超音波発生装置で10分間ソニケーションを行つた。Sepharose 4Bでゲル化沪過後、各フラクションについて平均粒径、リン脂質濃度を測定した。

次に30℃のTris-HCl Buffer液中（pH=8.6）で、カルボキシフルオレセインの漏出をけい光測定で追跡した。その結果を第1図に示した。第1図において縦軸は漏出したカルボキシフルオレセインのわりあいを示し、横軸は時間を示す。第1図において線①は卵黄レシチンのみを用いて作つたリポソーム、線②は卵黄レシチンとコレステロールを3：1の割合で用いて作つたリポソーム、線③は本実施例のリポソームを示す。①、②、③とも平均粒径0.28μmのフラクションを用いて測定したものである。第1図から本発明の化合物を用いることにより、リポソーム内容物の漏出が少なくなることがわかる。

本発明の化合物の種類や量を変えても同様の傾向が得られた。

4. 図面の簡単な説明

第1図は3種のリポソームからの内容物（カルボキシフルオレセイン）の漏出度の時間変化を示したグラフである。

線①は卵黄レシチンのみを用いたリポソーム、

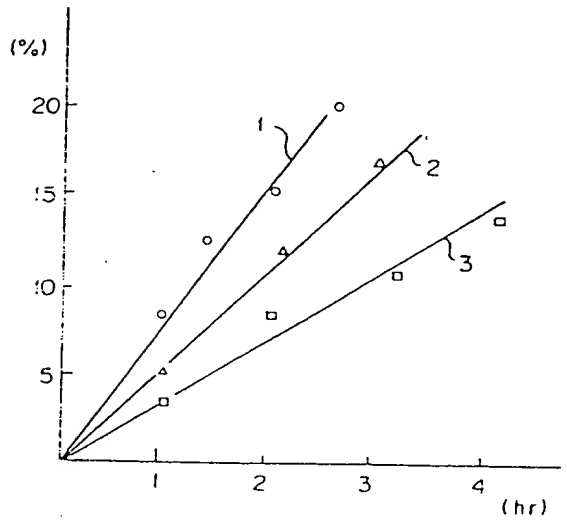
線②は卵黄レシチンとコレステロールを3：1の割合で用いて作成したリポソーム、

線③は実施例1のリポソーム、

を表わす。

特許出願人　富士写真フイルム株式会社

第1図



手続補正書

昭和63年9月17日

特許庁長官　殿

1. 事件の表示　　昭和63年特願第76862号

2. 発明の名称　　リポソームの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係　　特許出願人

住所　　神奈川県南足柄市中沼210番地

名称(520)富士写真フイルム株式会社

代表者　　大西　實

連絡先　〒106 東京都港区西麻布2丁目26番30号
富士写真フイルム株式会社 東京本社
電話（406）2537

4. 補正の対象　明細書の「発明の詳細な説明」の欄

5. 補正の内容

明細書の「発明の詳細な説明」の項の記載を下記の通り補正する。

1）第3頁10行目の
「ポソーム膜」を
「リポソーム膜」
と補正する。

2）第11頁8行目の
「カンペステロール」を
「エルゴステロール」
と補正する。

以　上

、ポ
ヘテル、シ
ノ性界面活性剤
アルキルスルホサク

(19) Japan Patent Office (JP) (11) Publication No.

(12) Unexamined Patent Gazette (A) 1-249717

(51) Int. Cl.[4]	Code	Patent Office filing no.	(43) Published 5 October 1989
A 61 K 9/10	327	F-7417-4C	
C 07 D 251/46		7822-4C	

Request for examination not requested Number of claims 1 (Total 7 pages)

(54) Title of the invention Method for making liposomes

(21) Application No. 63-76862

(22) Filing Date 30 March 1988

(72) Inventor M. Ono
Fuji Shashin Film KK, 210 Nakanuma, Minamiashigara-shi, Kanagawa-ken

(71) Applicant Fuji Shashin Film KK [Fuji Photo Film Co.]
210 Nakanuma, Minamiashigara-shi, Kanagawa-ken

Specification

1. Title of the invention

Method for making liposomes

2. Claims

Method for making a liposomes, characterized in that a 2,4-bis(polyethylene glycol)-6-amino-*s*-triazine derivative represented by General Formula (1) and a lipid are used.

In the formula, n represents an integer 6-200, and R_1 and R_2 represent (a) hydrogen atom(s), alkyl group(s), alkylcarbonyl group(s) and/or alkylsulphonyl group(s). R_3 and R_4 represent (a) hydrogen atom(s) and/or (a) methyl group(s). Given that the amino group of General Formula I does not mean an amino residue contained within an enzyme or protein.

3. Detailed explanation of the invention

(Field of the invention)

The present invention relates to specific 2,4-bis(polyethylene glycol)-6-substituted-*s*-triazine derivatives useful for making liposomes.

(Prior art)

Liposomes are known to be formed from bilayers of a large number of lipids (vesicles) with a constant mutual gap maintained normally by a water-based substance. There have been many reports of attempts to apply such liposomes to drug delivery (e.g. G. Gregoriadis: *New England Journal of Medicine* **195**, 765 (1976)).

However, when employed for drug delivery considerable drawbacks have been pointed out. Thus, these include the instability of a structure relying on fate which is a molecular aggregate due to interaction not based on covalent bonding, and drug leakage. A method for making liposomes coated with a polysaccharide (Japanese Unexamined Patent 61-69801), and phospholipid structurally reinforced by hydrogen bonding (*Nippon Kagakkaishi [J. Chem. Soc. Japan]* p. 569 (1987)), have hitherto been disclosed with the aim of improving this point. However, they cannot said yet to be adequate, and the development of new methods has been strongly desired.

(Purpose of the invention)

The purpose of the present invention is to offer a method for making stable liposomes with which there is little drug leakage.

(Constitution of the invention)

The present relates to a method for making polysome[a] membranes characterized in that the liposomal membrane is constituted by a lipid and a 2,4-bis(polyethylene glycol)-6-substituted amino-*s*-triazine derivative shown by Formula 1.

---

[a] Corrected to "liposome" by Amendment 1. Trans.

In Formula 1 n represents an integer 3-100; it is preferably 8-200, and can be a mixture. In the case of a mixture, it is desirable that the polyethylene glycol portion has an average molecular weight of 350-5000.

In the formula R_1 and R_2 are (a) hydrogen atom(s), alkyl group(s), alkylcarbonyl group(s) and/or alkylsulphonyl group(s).

Alkyl groups can be straight chain or branched chain. The alkyl group(s) can also have (a) substituent group(s); substituent groups can be selected from alkylcarboxyl groups, alkylcarbamoyl groups, alkylthio groups and alkyloxy groups. When R_1 and R_2 represent alkyl groups it is desirable that they have 8-30 carbons.

When R_1 and R_2 represent alkylcarbonyl groups it is desirable that they have 8-30 carbons. The alkyl group thereof can be a straight chain or branched chain, and may have the substituent groups mentioned previously.

When R_1 and R_2 represent alkylsulphonyl groups it is desirable that they have 8-30 carbons. The alkyl group thereof can be a straight chain or branched chain, and may have the substituent groups mentioned previously.

In Formula 1 R_3 and R_4 represent (a) hydrogen atom and/or methyl group(s).

Next, we give examples of compounds shown by Formula I; however, the range of the present invention is not restricted to these.

1.

White powder m.p. 109-113°C

n here is not a single value but is a mixture of average molecular weight 5000. (Obtainable easily from Seikagaku Kogyo KK. See Embodiments)

2.

White powder m.p. 98-102°C

n is the same as in 1

3.

White powder m.p. 120-123°C

n is as in 1.

4.

White crystals m.p. 120-123°C

n is as in 1.

5.

Oil

n here is not a single value but is a mixture of average molecular weight 400.

6.

n is as in 5.

7.

Oil

n here is not a single value, but is a mixture in which the average molecular weight of the polyether portion is 600.

8

Oil

n here is not a single figure, but it a mixture in which the average molecular weight of the polyether portion is 1000.

Examples of synthesis

Synthesis of example compound 1

(Active PEG_2 made by Seikagaku Kogyo KK)

Na_2CO_3

toluene

Na_2CO_3 1.0 g and the amine 1 g were put into 30 ml of toluene and stirred at room temperature. Into this was put 1 g of Seikagaku Kogyo KK Active PEG_2, and the mixture was reacted at room temperature for 2 hours. After filtration and concentration, 5 ml of water was added and the insoluble material was filtered out; the filtrate was applied to a Sepharose 4B column eluted with 500 ml of water, and fractionated into 10-ml fractions, and on freeze-drying the liquid in fractions 15-28 the intended compound 1 was obtained as a white powder. 0.89 g.

Its structure was confirmed by NMR.

Synthesis of example compound 2

Active PEG_2

A 2 g was put into 30 ml of tetrahydrofuran and stirred at room temperature. Activated PEG_2 1 g was added and stirred for 2 hours at room temperature. Gel filtration using Sepharose 4B was performed with the same separation conditions as for example compound 1, and 0.7 g of B was obtained.

Compound B 0.5 g was dissolved in anhydrous tetrahydrofuran, and then 2 ml of triethylamine was added. $C_{11}H_{23}C(=O)-Cl$ (0.3 g) dissolved in tetrahydrofuran was added dropwise. The tetrahydrofuran was evaporated off and water added; after filtering out the insoluble matter the filtrate was concentrated, and on cooling 0.43 g of the intended compound 2 was obtained.

Synthesis of example compound 5

polyethylene glycol

Polyethylene glycol (mean molecular weight 400, Wako Pure Chemicals) 80 g was added to 300 ml of anhydrous tetrahydrofuran, and NaH (60% dispersion) 8.0 g was added slowly under cooling; the temperature was returned to room temperature and the system was stirred for 1 hour.

Trichlorotriazine 18.4 g was added to the mixture, followed by stirring for 2 hours at room temperature and then stirring for 1 hour at an oil temperature of 60°C. The residue after evaporating the tetrahydrofuran off under decreased pressure was redissolved in chloroform, and on purification by means of silica column chromatography (silica gel 3 kg, eluted with chloroform) 53 g of the intended compound A was obtained in the form of an oil.

Amine B 4.7 g and triethylamine 2 g were dissolved in 50 ml of tetrahydrofuran. Compound A 9.1 g was added to this, followed by stirring at room temperature for 5 hours. The tetrahydrofuran was evaporated off at decreased pressure and the residue was redissolved in chloroform, and on separation and purification by column chromatography (silica gel 400 g, eluted with chloroform) 7.1 g of the intended compound 5 was obtained.

As phospholipid used for forming liposomes, phosphatidylcholine, phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine or sphingomyelin from egg yolk, soyabean or other animal or plant source, or synthetically obtained dipalmitoyl lecithin, distearoyl lecithin or dimyristoyl lecithin, etc., can be cited.

Next, examples of hydrophilic drugs which can be incorporated in liposomes include

anti-neoplastic agents such as adriamycin, actinomycin, mitomycin, 1-β-arabinofura|no|syl-cytosine, bleomycins and cisplatin, etc., antiviral agents such as interferons, etc., amino-glycosides (e.g. gentamycin) and β-lactam antibiotics (e.g. sulbenicillin, cefotiam and cefmenoxime), etc., peptide hormones such as TRH, "ryûburoraido" [?] and insulin, etc., enzymes such as lysozyme, asparaginase and glycosidases, etc., immunological adjuvants such as muramyl dipeptide, etc., and proteins such as immunoglobulins and various toxins, etc.

There is no specific restriction as to the quantity of compound represented by Formula 1 that is included in making liposomes of the present invention, but preferably the ratio is 0.1-1.0 to 1 of composite phospholipid forming the liposomes (weight ratio).

It can also be mixed with additives such as sterols, etc. (e.g. cholesterol, β-sitosterol, stigmasterol or campesterol[b], etc.).

For forming liposomes using a compound represented by Formula 1 and a phospho-lipid many normal methods for making liposomes are known: namely vortexing (A. B. Bangham *J., Mol. Biol.* **13**, 238 (1965)), sonication (C. Huang, *Biochem.* **8**, 344 (1969)), "purebeshitaru" method (H. Trauble, *Neurosci. Res. Prog. Bull.* **9**, 273 (1971)), ethanol infusion (S. Batziri, *Biochem. Biophys. Acta* **298**, 1015 (1973)), French press extrusion (Y. Barenhollz, *FEBS Lett.* **99**, 210 (1979)), cholic acid removal (Y. Kagawa, *J. Biol. Chem.* **246**, 5477 (1971)), Triton X-100 batch pouring (W. J. Gerrilsen, *Eur. J. Biochem.* **85**, 255 (1978)), Ca^{2+} [illegible] (D. Pahadjopoulos, *Biochem. Biophys Acta* **394**, 483 (1975)), ether infusion (D. Dreamer, *Biochim. Biophys. Acta* **443**, 629 (1976)), annealing (R. Lawaczeck, *Biochem. Biophys. Acta* **443**, 313 (1976)), freeze/thaw [illegible] (M. Kasahara, *J. Biol. Chem.* **252**, 7384 (1977)), W/O/W emulsion method (J. Matsumoto, *J. Colloid Interface Sci.* **62**, 149 (1977)) and reverse-phase evaporation (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 4194 (1978)), etc., and in the present invention any of the above methods can be used, although it is not restricted to these.

(Benefits of the invention)

The compounds of the present invention are efficacious compounds for minimizing the leakage of the contents of liposomes formed when lipid is dispersed in water. Thus, by mixing a phospholipid with a polyethylene glycol derivative represented by Formula 1, the

---

[b] Changed to ergosterol in Amendment 2. Trans.

surface of the liposomes becomes covered with the polyether, and leakage of the contents of the liposomes is minimized. Compounds represented by Formula 1 have the basic structure of a crown ether and hold firmly surfaces which take up Na^+ and K^+ which are abundant in the body. They can also suppress aggregation of the liposomes themselves by producing a strong charge in the surface. In addition, the ether chains suppress leakage of liposome contents from the inside of the liposomes by hydrogen bonding directly or via water molecules with hydrophilic portions of the lipid.

It has also already been confirmed in numerous animal experiments that the polyethylene glycol portion accounting for the major portion of compounds represented by Formula 1 is harmless from the viewpoint of biotoxicity, which is a drawback of artificial lipids (*Nihon Gan Kagaku Chiryo Zasshi (Jpn. J. Cancer Chemotherapy)* **11**, 2227 (1984), so that the present invention is also very beneficial from this point of view.

Embodiment 1

Egg yolk lecithin 30 mg, example compound 2 (10 mg) and cholesterol (1.4 mg) were dissolved in chloroform (3 ml), which was evaporated off at decreased pressure to form a thin membrane. After thorough drying, 3 ml of carboxyfluorescein buffer solution (200 mM Tris-HCl buffer, pH = 5.6, containing 200 mM NaCl) was added, and after vortexing for 5 minutes the mixture was sonicated for 10 minutes using an ultrasound generating device in the form of a probe. After gel filtration with Sepharose 4B, the mean particle size and phospholipid concentration were determined in each fraction.

Next, carboxyfluorescein leakage at 50°C in Tris-HCl buffer (pH = 8.6) was followed by determining fluorescence. The results are shown in Figure 1. In Figure 1 the y-axis shows the percentage of carboxyfluorescein leakage and the x-axis shows time. In Figure 1 line 1 is for liposomes made using only egg yolk lecithin; line 2 is for liposomes made using egg yolk lecithin and cholesterol in the proportions 3 : 1; and line 3 shows the liposomes of the present invention. In the case of 1, 2 and 3 the determinations were made using the fraction of mean particle size 0.28 μm. From Figure 1 it evident that leakage of the liposome contents is minimized by using a compound of the present invention.

The same tendency was obtained when the type and quantity of compound of the present invention were altered.

4. Simplified explanation of the diagrams

Figure 1 is graphs of changes in the degree of leakage of contents (carboxy-fluorescein) from 3 types of liposomes.

Line 1 represents liposomes using only egg yolk lecithin;

Line 2 represents liposomes made using lecithin and cholesterol in the proportions 3:1;

Line 3 represents liposomes of Embodiment 1.

Applicant Fuji Photo Film Co.

Figure 1

AMENDMENT

19 September 1988

To the Director of the Patent Office

1. Indication of the matter 1988 Patent Application 76862

2. Title of the invention Method for making liposomes

3. Amending party

Involvement with the matter Applicant

Address 210 Nakanuma, Minamiashigara-shi, Kanagawa-ken

Title (520) Fuji Shashin Film KK (Fuji Photo Film)

Agent A. Onishi

4. Subject to amendment "Detailed explanation of the invention" of the specification

5. Contents of amendments

Amend the columns of "Detailed explanation of the invention as listed below.

1) In column 3 line 10, amend "polysome membranes" to "liposome membranes".

2) In column 14 line 8, amend "campesterol" to "ergosterol".

MITAKA LIMITED
4-12 Morton Street, Leamington Spa, Warwickshire, CV32 5SY
Tel 01926 311126 Fax 01926 332990 Modem 01926 881147

Fao Dr Richard Williams
Hepworth, Lawrence, Bryer & Bizley
Baker's Lane
EPPING
Essex
CM16 5DQ

Mitaka Job Number: 39068
Your Ref: KF95355
12 September 1995

DESPATCH NOTE

Summary of Despatched Documents:

Translation from Japanese as requested. (Hard copy follows by post)

Despatch Method:

First Class Post: X **Special Delivery:** **Courier:**
FAX **X (11 pages text)**

Dear Dr Williams

Please find enclosed the items listed above. If there are any problems please telephone me immediately.

It is **VERY IMPORTANT** that you do not sign for goods damaged in transit, contact Mitaka.

Yours sincerely

Ray

Ray Morrison

Mitaka Limited